
Verfahren zur Untersuchung einer Gewebeprobe

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung einer Gewebeprobe gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Eine Vielzahl von Erkrankungen beruht auf morphologisch erfassbaren Gewebsveränderungen. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem gut- und bösartige Gewebeproliferationen, Krebserkrankungen, Entzündungen oder neurodegenerative Erkrankungen.

In vielen Fällen werden zur Diagnose solcher Krankheiten Gewebeproben standardmäßig mit histologischen Methoden untersucht. Diese Methoden sind inzwischen so gut etabliert, daß sie für viele Krankheiten eine hohe Diagnosesicherheit bieten, und gelten daher z.B. in der Tumordiagnostik als "Goldstandard".

Sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Diagnostik spielt inzwischen jedoch die molekularbiologische Charakterisierung von Erkrankungen eine immer wichtiger werdende Rolle. Erkrankte Gewebe unterscheiden sich von gesunden Geweben in bestimmten molekularbiologisch erfaßbaren Größen, wie z.B. genomischen Sequenzen, mRNA-Sequenzen, dem Proteom, der Methylierung der genomischen DNA, der Anwesenheit viraler oder bakterieller Nukleinsäuren, und/oder der Anwesenheit pathogener Moleküle.

Einige Krankheitstypen zeichnen sich sogar durch charakteristische Gensequenzmuster, Genexpressionsprofile oder DNA-Methylierungsmuster aus, die molekularbiologisch erfasst und zur Diagnose dieser Krankheiten herangezogen werden können. Viele Krankheiten, so z.B. Varianten verschiedener Tumortypen, die sich häufig in ihrer Virulenz bzw. ihrer Therapierbarkeit wesentlich voneinander unterscheiden, werden durch eine solche Herangehensweise überhaupt erst diagnostizierbar, da sie sich im histologischen Schnitt nicht differenzieren lassen. Die molekularbiologische Charakterisierung ist daher ein vielversprechender Ansatz, um Gewebeerkrankungen genauer zu diagnostizieren und gegebenenfalls individualisierte Therapien zu ermöglichen. Hierzu eignen sich im besonderen die in jüngerer Zeit entwickelten molekularbiologischen Methoden der Hochdurchsatz-Analytik mit Nukleinsäure- oder Proteinarrays ("Mikroarrays").

Die Vorteile einer molekularen Herangehensweise in der Gewebediagnostik sind in der Schrift "Microarray and histopathological analysis of tumors: The future and the past ?" von S.R. Lakhani und A. Ashworth (Nature Reviews 2001, 151) skizziert.

Wesentliches Problem bei der molekularbiologischen Untersuchung einer Gewebeprobe ist, daß die erhaltenen Ergebnisse schwer zu interpretieren sind. Es ist z.B. denkbar, daß in einem bekannten Tumor X ein bestimmtes Gen Y typischer Weise überexprimiert wird. Eine reine Tumorseite würde bei der molekularbiologischen Untersuchung sofort durch einen stark erhöhten Genexpressionswert auffallen. Wenn die untersuchte Probe jedoch nur zu einem geringen Teil Tumorgewebe enthält, wäre der Genexpressionswert der Gesamtprobe lediglich gering erhöht und es wäre schwierig, einen solchen Genexpressionswert korrekt zu interpretieren.

Es ist auch denkbar, daß ein bekannter Tumor X' ein bestimmtes Genexpressionsprofil Y' aufweist, also ein charakteristisches Muster von Genexpressionswerten zweier oder mehrerer Gene. In diesem Fall würde die Verunreinigung der untersuchten Probe durch Nicht-Tumorgewebe das tumorspezifische Genexpressionsprofil Y' verzerren und damit eine Diagnose unmöglich machen.

Aus der Schrift "A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer" von de Vijver et al. (The New England Journal of Medicine 2002, Vol. 347, 1999) ist ein Verfahren zur Untersuchung einer Gewebeprobe auf krankhafte Gewebeanteile bekannt, bei dem aus der Gewebeprobe Schnitte hergestellt werden, von denen mindestens einer einer histologischen und mindestens ein weiterer einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung, nämlich einer molekularbiologischen Mikroarray-Analyse, unterzogen werden.

Dabei wird eine eingefrorene Gewebeprobe in ein Mikrotom gebracht, wo eine Schnittfolge hergestellt wird. Ein oder mehrere Schnitte aus der Schnittfolge werden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und histologisch begutachtet. Dabei wird der Anteil der Tumorzellen in den einzelnen Schnitten bestimmt. Liegt dieser über 50 %, so werden korrespondierende Schnitte aus derselben Schnittfolge für die molekularbiologische Untersuchung verwendet. Liegt der Anteil der Tumorzellen in dem Schnitt unter 50 %, so wird die gesamte Schnittfolge verworfen.

Das über die vorgeschaltete histologische Untersuchung gewonnene Wissen über die Zusammensetzung der Probe wird also lediglich dafür verwendet, zu entscheiden, ob die Probe ein bestimmtes Ausschlußkriterium erfüllt oder nicht.

Das erwähnte Verfahren kommt in der Grundlagenforschung zum Einsatz, z.B. zum Aufbau von Genexpressionsdatenbanken, und greift dazu auf Gewebeban-

ken mit relativ großen Gewebeproben zurück. Im Fall, dass die zu untersuchende Probe das Ausschlußkriterium nicht erfüllt, wird eine neue Probe aus der Gewebebank genommen, erneut histologisch auf ihren Anteil an Tumorgewebe untersucht und dann gegebenenfalls der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt.

In der klinischen Diagnostik dagegen, wo häufig nur wenig Probenmaterial eines individuellen Patienten zur Verfügung steht und es in der Regel - insbesondere bei der intra und perioperativen Diagnostik - auf ein schnelles Untersuchungsergebnis ankommt, ist dieses Vorgehen nicht praktikierbar. Würde sich bei der histologischen Voruntersuchung einer patientenspezifischen Probe nämlich herausstellen, dass der Anteil an Tumorzellen zu gering ist und die Probe somit das Ausschlußkriterium nicht erfüllt, müßte auf die molekularbiologische Analyse völlig verzichtet werden, da das zur Verfügung stehende Probenmaterial bereits verbraucht und/oder keine Zeit mehr vorhanden wäre, eine neue Probe zu entnehmen bzw. zu untersuchen. Die beschriebene Methode würde in der klinischen Diagnostik also nicht bei allen Gewebeproben zusätzlich zu der histologischen Untersuchung auch eine molekularbiologische Untersuchung ermöglichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein für die Diagnose geeignetes Verfahren zur Untersuchung einer Gewebeprobe auf krankhafte Gewebeanteile und/oder weitere relevante Komponenten sowie deren Beziehung zueinander bereitzustellen, bei dem einzelne Proben einer histologischen und einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen werden.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Ansprüche 1 und 2 gelöst.

Demach ist ein Verfahren zur Untersuchung einer Gewebeprobe, deren genomische und/oder proteomische und/oder epigenomische und/oder biophysikalische

Eigenschaften im wesentlichen erhalten sind, auf krankhafte Gewebeanteile vorgesehen. Wie in bekannten Verfahren werden dabei aus der Gewebeprobe in üblicher Weise Schnitte hergestellt, von denen mindestens einer einer histologisch-zytologischen und mindestens ein weiterer einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung Untersuchung unterzogen werden.

Unter dem Begriff "nicht-morphologische Analyseuntersuchung" werden im folgenden insbesondere molekularbiologische Untersuchungen verstanden. Dabei wird überwiegend der Begriff "molekularbiologische Untersuchungen" verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind nicht-morphologische Analyseuntersuchungen jedoch auch biophysikalische Untersuchungen, wie z.B. Verfahren zur Messung des Redoxpotentials, des pH-Werts, der Temperatur, des Sauerstoffpartialdrucks oder zur Bestimmung von Metaboliten wie Lactat oder Pyruvat.

Aus der histologisch-zytologischen Untersuchung wird erfindungsgemäß mindestens der quantitative Anteil des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen und/oder ein anderer morphologischer Aspekt in der Gewebeprobe mittels eines Bildverarbeitungssystems ermittelt und dann als Bezugsgröße der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt. Während der histologisch-zytologischen Untersuchung kann z.B. auch der Anteil von nekrotischem Gewebe, Entzündungszellen oder nicht-krankhaftem Bindegewebe bestimmt und bei der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung berücksichtigt werden.

Die Bestimmung des quantitativen Anteils des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen kann z.B. erfolgen, indem ein Schnitt zunächst gefärbt und dann mithilfe eines insbesondere computergestützten Bildverarbeitungssystems begutachtet wird. Ein solches System besteht i.d.R. aus einem optischen System (z.B.

Mikroskop), einem Bilderfassungssystem (z.B. CCD-Kamera und Bilderfassungskarte), einem Computer sowie einer geeigneten Software. Mit Hilfe eines solchen Systems lassen sich aus histologischen Präparaten automatisiert und reproduzierbar in kurzer Zeit eine Vielzahl von Größen ermitteln.

Mit dem Bilderfassungssystem wird erfindungsgemäß mindestens der quantitative Tumorgewebsanteil und/oder ein anderer morphologischer Aspekt in der Gewebeprobe mittels des Bildverarbeitungssystems ermittelt, was bei entsprechender histologischer Vorbehandlung der Probe z.B. durch Auszählen von gefärbten Zellen und/Zellkernen bzw. Integration von gefärbten Gewebebereichen (um nur zwei Beispiele zu nennen) zuverlässig möglich ist.

Damit läßt sich z.B. die Bezugsgröße ermitteln, mit der ein experimentell erfaßtes Genexpressionsmuster korrigiert werden kann, um es mit den in entsprechenden Datenbanken gespeicherten Mustern zu vergleichen.

Bei der Begutachtung wird wie oben gesagt z.B. durch Auszählung der Zellkerne der quantitative Anteil an krankhaftem Gewebe in der Probe ermittelt und als Bezugsgröße - z.B. in Form einer Prozentzahl - notiert. Bei der molekularbiologischen Untersuchung eines weiteren Schnitts wird dann z.B. das Expressionsmuster von 10 krankheitstypischen Genen quantitativ erfasst.

Um das erfasste Expressionsmuster zu interpretieren, muß dieses mit einer Datenbank verglichen werden, in der bekannte standardisierte Expressionsmuster einer Mehrzahl von Krankheiten gespeichert sind. Solche Standard-Genexpressionsprofile werden zur Zeit in verschiedenen Labors weltweit für eine Vielzahl von Tumor- und Gewebsarten ermittelt. Das erfindungsgemäße Verfahren kann hierzu, wie weiter unten beschrieben, einen Beitrag leisten.

Standardisierte Expressionsmuster sind jedoch nicht unmittelbar mit dem experimentell erfassten Expressionsmuster vergleichbar, da sie sich auf standardisierte Proben beziehen, die z.B. ausschließlich krankhaftes Gewebe enthalten haben.

Mit Hilfe der zuvor ermittelten Bezugsgröße kann nun das experimentell erfasste Expressionsmuster korrigiert und dann unmittelbar mit den in der Datenbank gespeicherten Mustern verglichen werden. Folglich kann auch das Genexpressionsmuster von solchen Proben, die einen hohen Anteil an nicht krankhaftem Gewebe aufweisen, sinnvoll ausgewertet und diagnostisch interpretiert werden.

In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass aus der Gewebeprobe eine Stichprobe entnommen wird, und mindestens eine Teilprobe der Stichprobe einer histologisch-zytologischen und mindestens eine weitere einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen wird. Ebenso gut können der Gewebeprobe mehrere Stichproben entnommen werden, wobei mindestens eine davon einer histologisch-zytologischen und mindestens eine weitere einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen wird. Bei dieser Ausgestaltung ist ebenfalls denkbar, dass nur Teilproben der einzelnen Stichproben den verschiedenen Untersuchungen zugeführt werden.

Dabei wird ebenfalls aus der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens der quantitative Anteil des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der Gewebeprobe oder der Stichprobe ermittelt, und der ermittelte quantitative Anteil als Bezugsgröße der Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung zugrunde gelegt. Diese Variante unterscheidet sich von der vorgenannten also lediglich dadurch, dass anstelle von Schnitten eine oder mehrere Stichproben angefertigt werden. Das zu der vorgenannten Variante Gesagte gilt also analog auch für die Stichproben bzw. deren Teilproben.

In einer anderen bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass die Stichprobe einer einem Patienten entnommenen Gewebeprobe entnommen wird. Bei diesem Verfahren der *ex-vivo*-Stichprobe können die Stichproben bzw. die Teilproben z.B. mit Hilfe einer Bohrkernsonde oder durch Aspiration mit einer Feinnadel entnommen werden. Dies hat den Vorteil, daß die Gewebeprobe nicht zerstört wird und z.B. die Tumorränder unbeeinträchtigt bleiben.

Ebenso ist es möglich, die *ex-vivo*-Stichprobe bzw. die Teilproben mit Hilfe der sogenannten Kratzprobentechnik zu gewinnen. Diese Technik ist unter dem Begriff "Epithelial Aggregate Separation and Isolation" bekannt. Dabei wird z.B. ein angekanteter Objektträger mit leichtem Druck über die Schnittfläche einer entnommenen und durchgeschnittenen Gewebeprobe geführt. Bei festeren Geweben kann auch die Klinge eines Skalpells oder eines anderen geeigneten Instruments über die Oberfläche geführt werden. Tumorzellaggregate, die im Gegensatz zu dem umgebenden nicht-malignen Gewebe in Inseln organisiert sind und leicht aus der Schnittfläche herausragen, werden dabei gezielt auf dem Objektträger bzw. der Skalpellklinge angereichert.

Das dergestalt erhaltene Kratzpräparat kann direkt in zwei Teilproben aufgeteilt werden, von denen erfindungsgemäß die eine der histologisch-zytologischen und die andere der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt werden kann. Aus dem erhaltenen Kratzmaterial kann aber auch zunächst eine Suspension hergestellt werden, die erst dann in zwei Teilproben aufgeteilt wird. Bei dem letzteren Verfahren ist eine bessere Randomisierung der Zusammensetzung der einzelnen Teilproben gewährleistet.

Ebenso kann jedoch vorgesehen sein, das Kratzmaterial zunächst zu waschen und zu zentrifugieren, das erhaltene Pellet zu resuspendieren und anschließend in ei-

nem Dichtegradienten erneut zu zentrifugieren. Mindestens eine der dabei erhaltenen Fraktionen wird dann aufgeteilt, und erfindungsgemäß wird dann eine Teilprobe der histologisch-zytologischen und die andere der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführt. Das Kratzmaterial kann jedoch auch mit jeder anderen geeigneten Anreicherungs- und/oder Fraktionierungstechnik aufbereitet werden.

Auf der Schnittfläche der mittels Kratztechnik behandelten Gewebeprobe bleibt das nicht-maligne Gewebe unter weitestgehender Bewahrung seiner Gewebsstruktur zurück, während die Bereiche, in denen zuvor die Tumorzellaggregate angesiedelt waren, fehlen und damit in der Aufsicht als Vertiefungen erkennbar sind. Die Gewebeprobe kann nun z.B. in herkömmlicher Weise mit einem Mikrotom geschnitten werden. Dabei entspricht der erste Schnitt der Schnittfolge der durch die Kratzpräparation entreicherten Schnittfläche der Gewebeprobe. Dieser Schnitt kann z.B. histologisch auf verbliebene Tumorzellaggregate untersucht werden und gibt damit Auskunft über den Erfolg der Probenahme. Der Schnitt kann so als Negativkontrolle für die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse der Kratzprobe dienen.

Weitere Schnitte der Schnittfolge bestehen dagegen sowohl aus nicht-malignem Gewebe als auch aus Tumorgewebe und können daher, wie bereits beschrieben, erfindungsgemäß einerseits einer histologisch-zytologischen und andererseits einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen werden. Dabei ist es besonders erfolgversprechend, die erhaltenen histologisch-zytologischen und molekularbiologischen Ergebnisse mit denen des Kratzpräparats abzugleichen.

Wesentlich bei all den beschriebenen Verfahren ist es durchweg, dass von einer Gewebeprobe mindestens zwei Schnitte oder Stichproben (z.B. Bohrkernproben, Feinnadelaspirate, Kratzpräparate) bzw. mindestens zwei Teilproben einer Stich-

probe hergestellt und einer histologisch-zytologischen bzw. einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführt werden.

Weiterhin ist es durchweg wesentlich, dass aus der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens der quantitative Anteil des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der Gewebeprobe oder der Stichprobe ermittelt wird und dann als Bezugsgröße der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt wird. Die einzelnen Schnitte, Stichproben bzw. deren Teilproben werden im folgenden da, wo es sinnvoll ist, unter dem Begriff "Teilproben" zusammengefaßt.

Es ist natürlich denkbar, dass in einem Verfahren aus einer Gewebeprobe sowohl Schnitte als auch z.B. Bohrkernproben angefertigt werden. So könnten die Schnitte der histologisch-zytologischen Untersuchung zugeführt und die aus der selben Probe entnommenen Bohrkernproben einer molekularbiologischen Untersuchung unterzogen werden. Ebenso gut ist es denkbar, dass, wie bereits beschrieben, in einem Verfahren aus einer Gewebeprobe sowohl Schnitte als auch Kratzpräparate hergestellt werden. Ausgestaltungen, bei denen verschiedene Arten der Gewinnung von Schnitten, Stichproben bzw. deren Teilproben miteinander kombiniert werden, sollen daher ausdrücklich ebenfalls von der vorliegenden Erfindung abgedeckt werden.

Ein wichtiger Aspekt der Erfindung ist, dass bei der histologisch-zytologischen Untersuchung neben dem quantitativen Anteil zusätzlich das Erscheinungsbild und/oder das Verteilungsmuster des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen bzw. weiterer Komponenten in der Gewebeprobe ermittelt und der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt werden kann. Denkbare Parameter, die in diesem Zusammenhang durch das Bilderfassungssystem neben den bereits erwähnten Zellzahlen bzw. Flächen

ermittelt werden können, sind z.B. der Abstand von gefärbten Zellen und Zellkernen zueinander bzw. zu anderen Strukturen, insbesondere z.B. Blutgefäße, bzw. das Erscheinungsbild einzelner Zellen (Außenkontur) etc., um nur einige Beispiele zu nennen. Grundsätzlich können alle geeigneten und morphologisch Parameter ermittelt werden, die für die ergänzende Qualifizierung bzw. Quantifizierung von krankhaften Zellen bzw. Gewebe geeignet sind.

So kann z.B. ein Erscheinungsbild, das sich in zahlreichen Auswachsungen eines Tumors in das umgebende Gewebe darstellt, ein Hinweis auf eine erhöhte Malignität des Tumors sein. Ein anderer Tumor, dessen molekularbiologische Charakteristik der des ersten Tumors ähnlich ist, der aber ein anderes Erscheinungsbild aufweist, kann dagegen weniger maligne sein. Das Erscheinungsbild würde in einem solchen Fall also wichtige Anhaltspunkte für die Interpretation der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung liefern. Ähnliches gilt für das Verteilungsmuster des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der Gewebeprobe.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die Schnitte bzw. die Stichproben direkt aus der frischen Gewebeprobe hergestellt werden. Dieses Vorgehen gewährleistet, dass die genomischen, proteomischen und/oder epigenomischen Eigenschaften der Probe bestmöglich erhalten sind. Für die Herstellung von Schnitten kann dabei z.B. ein Vibratom zum Einsatz kommen.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die Gewebeprobe vor Herstellung der Schnitte bzw. der Stichproben eingefroren wird. Auch dieses Vorgehen gewährleistet die Erhaltung der genomischen, proteomischen und/oder epigenomischen Eigen-

schaften der Probe. Für die Herstellung von Schnitten kann dabei z.B. ein Mikrotom oder ein Kryotom verwendet werden.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die Gewebeprobe vor Herstellung der Schnitte bzw. vor Entnahme der Stichproben gegebenenfalls konserviert und dann in einem geeigneten Medium eingebettet wird. Ein solches Medium kann z.B. Paraffin oder ein anderes geeignetes Einbettungsmedium sein. In diesem Fall können z.B. Schnitte in üblicher Weise mit einem Mikrotom gewonnen werden. Wichtig dabei ist wiederum, dass die genomischen, proteomischen und/oder epigenomischen Eigenschaften der Probe erhalten bleiben.

Natürlich kann z.B. auch vorgesehen sein, dass von einer frischen Gewebeprobe zunächst ein Feinnadelaspirat oder eine Kratzprobe entnommen und einer molekularbiologischen Untersuchung unterzogen wird. Anschließend könnte die Gewebeprobe eingefroren werden und dann am Kryotom Schnitte angefertigt werden, die der histologisch-zytologischen Untersuchung zugeführt werden. Ausgestaltungen, bei denen verschiedene Arten der Vorbehandlung bzw. der Konservierung der Gewebeprobe miteinander kombiniert werden, sollen also ausdrücklich ebenfalls von der vorliegenden Erfindung abgedeckt werden.

Generell gilt also, dass alle zuvor geschilderten Schritte so gewählt sein müssen, dass sie die in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren (DNA, mRNA), Proteine und/oder das epigenomische Methylierungsmuster nicht oder möglichst wenig beeinträchtigen.

Eine besonders bevorzugte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist gerade in der klinischen Diagnostik sinnvoll einsetzbar. Routinemäßig wird in der klinischen Diagnostik die dem Patienten entnommene, zu diagnostizierende Gewebeprobe möglichst schnell in ein pathologisches Labor gebracht und dort in

zwei Proben aufgeteilt, wobei die zweite Probe für eine spätere, eingehende histologisch-zytologische Begutachtung fixiert und eingebettet wird, während die erste Probe unmittelbar auf einen Träger aufgebracht, eingefroren und am Mikrotom geschnitten wird ("Schnellschnitt"). Einzelne Schnitte werden dann histologisch gefärbt und sofort von einem Pathologen begutachtet, der dem behandelnden Arzt seine Diagnose mitteilt. Gerade in der intraoperativen Diagnostik, bei der der operierende Chirurg das weitere operative Vorgehen - z.B. eine nach der Entnahme eines Mammakarzinoms gegebenenfalls noch erforderliche Exzision der axillären Lymphknoten - von der telefonisch mitgeteilten Diagnose des Pathologen abhängig macht, hat dieses Verfahren eine große Bedeutung, und entsprechend muß auf eine Optimierung der Zeitabläufe geachtet werden.

Die bevorzugte Ausgestaltung sieht vor, dass die unmittelbar nach der Entnahme aus einem Patienten auf einen Träger aufgebrachte und eingefrorene Gewebeprobe mit einem Mikrotom geschnitten wird, und dass zusätzlich zu den Schnitten, die der histologisch-zytologischen Untersuchung zugeführt werden, andere Schnitte derselben Schnittfolge der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführt werden. Der Pathologe kann daher seine Diagnose zusätzlich auf molekularbiologische Befunde stützen und somit die Diagnosesicherheit erhöhen - ein Punkt, der gerade in der intraoperativen Diagnostik von großer Bedeutung ist.

Ein großer Vorteil dieses zusätzlichen Verfahrensschritts ist es, dass er sich nahtlos und ohne Zeitverlust in das routinemäßige Diagnoseprocedere integrieren läßt. Bei Verwendung eines geeigneten molekularbiologischen Untersuchungsverfahrens, wie z.B. einer arraybasierten mRNA-Analyse, können in relativ kurzer Zeit Untersuchungsergebnisse gewonnen werden, die gegebenenfalls sogar zeitgleich mit den histologischen Befunden an den behandelnden Arzt weitergeleitet werden können. Überdies wird bei diesem zusätzlichen Verfahrensschritt

das ohnehin beim Schnellschnitt anfallende überflüssige Material gewinnbringend genutzt.

Dabei ist in einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens vorgesehen, dass die Gewebeprobe nach der Anfertigung der Schnitte auf dem Träger verbleibt, so dass sie für die erneute Anfertigung von Schnitten zur Verfügung steht. Bei Verwendung eines Kryotoms und schneller Vorgehensweise ist dabei gewährleistet, daß die Gewebeprobe während des gesamten Prozesses gefroren bleibt und ohne wesentliche Temperaturbeeinflussung wieder im Gefrierschrank eingelagert werden kann. Es kann auch vorgesehen sein, daß die Probe vor oder während des Schneidens Temperatur annimmt und dann wieder eingefroren wird.

Beide Vorgehensweisen schaffen z.B. die Möglichkeit, eine einmal histologisch-zytologisch und/oder molekularbiologisch untersuchte Probe zu einem späteren Zeitpunkt erneut zu untersuchen, um dabei z.B. Methoden anzuwenden, die zu dem früheren Zeitpunkt noch nicht existierten, oder die Probe im Rahmen einer Studie erneut zu untersuchen. Sollte die Gewebeprobe auf andere Weise konserviert worden sein, z.B., wie bereits beschrieben, durch Einbettung in ein geeignetes Medium, kann natürlich ebenso vorgesehen sein, dass sie nach Anfertigung der Schnitte auf dem Träger verbleibt und für die erneute Anfertigung von Schnitten zur Verfügung steht. In diesem Fall kann auf das zwischenzeitige Einfrieren verzichtet werden.

Diese Ausgestaltung ist besonders vorteilhaft in Verbindung mit der im folgenden beschriebenen Ausgestaltung. Demnach ist vorgesehen, dass der Träger, auf den die Gewebeprobe aufgebracht ist, so gestaltet ist, dass er in reproduzierbarer Weise in das Mikrotom eingebracht werden kann, so dass die Gewebeprobe bei jeder Anfertigung von Schnitten die gleiche relative Orientierung zum Mikrotom aufweist. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß die zu einem späteren Zeitpunkt

erneut untersuchte Probe weitestgehend der früheren Probe entspricht und so die histologisch-zytologischen und/oder molekularbiologischen Befunde unmittelbar miteinander verglichen werden können.

Die Berücksichtigung des quantitativen Anteils des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der Gewebeprobe bei der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung macht nur Sinn unter der Annahme, dass die Schnitte, Stichproben bzw. Teilproben der Stichproben, die der histologisch-zytologischen bzw. der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführt werden, im wesentlichen gleich zusammengesetzt sind.

Idealerweise wäre dies der Fall, wenn für beide Untersuchungen dieselbe Probe verwendet werden könnte. Bei der Aufbereitung für die Histologie wird eine Probe in der Regel gefärbt und/oder fixiert, wobei die genomischen, proteomischen und/oder epigenomischen Eigenschaften der Probe beeinträchtigt werden. Umgekehrt wird eine Probe bei der Aufbereitung für die Molekularbiologie in der Regel homogenisiert. Dabei gehen sämtliche topologischen Informationen der Probe verloren. Die Aufbereitung einer Gewebeprobe für die eine Untersuchung macht die Probe also für die jeweils andere Untersuchung unbrauchbar. Es müssen also für die beiden Untersuchungen verschiedene Teilproben verwendet werden.

Wenn es sich bei den Teilproben z.B. um zwei unmittelbar benachbarte Schnitte aus einer Mikrotom-Schnittfolge handelt, kann im Allgemeinen davon ausgegangen werden, dass diese im wesentlichen gleich zusammengesetzt sind. Diese Annahme wird auch in pathologischen Fachkreisen allgemein akzeptiert.

Es ist jedoch denkbar, dass die Teilproben in ihrer Zusammensetzung voneinander abweichen, dass z.B. in der histologisch-zytologisch untersuchten Teilprobe das Tumorgewebe einen anderen quantitativen Anteil hat als in der molekular-

biologisch untersuchten Teilprobe. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn die Schnittfolge einen Bereich des Tumorrands erfasst, der parallel zur Schnittebene verläuft. Ein über die histologisch-zytologisch untersuchte Teilprobe ermittelter quantitativer Bezugsgröße würde folglich einen falschen Tumorgewebsanteil in der molekularbiologisch untersuchten Teilprobe vorspiegeln und so zu einer fehlerhaften Korrektur des experimentell erfassten Expressionsmusters führen. Ähnliches gilt, wenn in der histologisch-zytologisch untersuchten Teilprobe das Tumorgewebe ein anderes Erscheinungsbild oder ein anderes Verteilungsmuster aufweist als in der molekularbiologisch untersuchten Teilprobe.

Daher ist in einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen, dass der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens zwei Schnitte zugeführt werden, wobei diese so gewählt sind, dass sichergestellt ist, dass der oder die der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführten Schnitte *in situ* zwischen diesen Schnitten angeordnet waren. In der Praxis sieht dies so aus, dass zwei nicht unmittelbar benachbarte Schnitte einer Mikrotomschnittfolge gefärbt und histologisch-zytologisch begutachtet werden, während weitere, dazwischenliegende Schnitte der Mikrotomschnittfolge homogenisiert und z.B. einer arraybasierten mRNA-Analyse unterzogen werden. Die Anzahl der hierfür verwendeten Schnitte richtet sich in diesem Fall z.B. nach der für die Analyse erforderlichen mRNA-Menge.

Auf diese Weise sind einerseits die gewebspezifische Zusammensetzung zweier flankierender Schnitte und andererseits die molekularbiologischen Charakteristika einer oder mehrerer Schnitte bekannt, die in der ursprünglichen Gewebeprobe zwischen den flankierenden Schnitten angeordnet waren. Der quantitative Anteil, das Erscheinungsbild und/oder das Verteilungsmuster des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der oder den molekularbiologisch untersuchten Schnitten kann so verlässlich bestimmt werden.

Wenn z.B. der eine flankierende Schnitt einen Tumorgewebsanteil von 20 % und der andere flankierende Schnitt einen Tumorgewebsanteil von 80 % aufweist, kann der Pathologe annehmen, dass der Tumorgewebsanteil in den molekularbiologisch untersuchten Schnitten, die *in situ* zwischen den flankierenden Schnitten gelegen haben, im Bereich zwischen 20 und 80 % gelegen hat. Gegebenenfalls kann - unter Annahme einer gradientenartigen Änderung der gewebsspezifischen Zusammensetzung von einem Schnitt zum nächsten - aus den Tumorgewebsanteilen der flankierenden Schnitte auch der mittlere Tumorgewebsanteil der molekularbiologisch untersuchten Schnitte bestimmt oder berechnet werden. Auf diese Weise kann auch in diesen Fällen eine Bezugsgröße ermittelt werden, mit der z.B. das experimentell erfasste Genexpressionsmuster korrigiert und dann unmittelbar mit den in den Datenbanken enthaltenen Mustern verglichen werden kann.

Dies ist insbesondere dann möglich, wenn neben den flankierenden Schnitten noch ein oder mehrere weitere Schnitte, die *in situ* zwischen den molekularbiologisch untersuchten Schnitten angeordnet waren, auf ihre gewebsspezifische Zusammensetzung untersucht werden. Die zuvor beschriebene Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens soll ausdrücklich auch eine solche Ausgestaltung umfassen.

Ähnliche Vorteile gelten für eine weitere bevorzugte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren, demzufolge die Teilproben (also Stichproben bzw. deren Teilproben) die der histologisch-zytologischen Untersuchung zugeführt werden, so gewählt sind, dass sichergestellt ist, dass die der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführte mindestens eine Teilprobe *in situ* zwischen diesen Teilproben angeordnet war.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass, wie schon angedeutet, das Verfahren in der intraoperativen klinisch-pathologischen Diagnostik eingesetzt wird. Ebenso kann das Verfahren in der perioperativen Diagnostik eingesetzt werden, also vor oder kurz nach einem operativen Eingriff.

In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen des Verfahrens ist vorgesehen, dass bei der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung ein Verfahren zur Detektion von genomischer DNA, cDNA, mRNA, des epigenomischen Methylierungsmusters, Proteinen, viraler oder bakterieller Nukleinsäuren oder anderer Biomoleküle verwendet wird. Ebenso können bei der nicht-morphologischen Analyseuntersuchungen auch biophysikalische Verfahren, wie z.B. Verfahren zur Messung des Redoxpotentials, des pH-Werts, der Temperatur, des Sauerstoffpartialdrucks oder zur Bestimmung von Metaboliten wie Lactat oder Pyruvat verwendet werden.

Die Detektion von genomischer DNA kann z.B. somatische Mutationen aufdecken, die mit verschiedenen Gewbserkrankungen korreliert sein können. Die Detektion von cDNA, mRNA oder Proteinen kann Aufschluß über ein krankheitsspezifisches Genexpressionsmuster liefern. Die Detektion des epigenomischen Methylierungsmusters liefert u.U. Hinweise auf ein krankheitsspezifisches Genaktivierungsmuster. Die Detektion viraler Nukleinsäuren kann z.B. Auskunft über eine virusbedingte Gewbeproliferation liefern, während die Detektion bakterieller Nukleinsäuren z.B. die Diagnose bakteriell verursachter Gewbeveränderungen ermöglichen kann. Andere Biomoleküle, wie z.B. infektiöse Prionen, können auf eine prionenverursachte Gewbsveränderung hinweisen. Weitere Biomoleküle können z.B. Nukleinsäuren oder Proteine von pathogenen Parasiten sein.

In einer anderen, ebenfalls bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung eine Größe erfaßt wird, die es ermöglicht, den Anteil an krankhaftem Gewebe und/oder anderer Gewebskomponenten in der Gewebeprobe zu ermitteln, und dass der solchermaßen ermittelte Anteil zusätzlich quantitativ der Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung zugrunde gelegt wird.

Eine solche Größe kann z.B. das Expressionsmaß eines Gens sein, von dem man weiß, das es ausschließlich in gesundem Gewebe exprimiert wird, nicht jedoch in Tumorgewebe, und bei dem man überdies das normale Expressionsmaß kennt. Das Expressionsmaß dieses Gens in der molekularbiologisch untersuchten Teilprobe liefert eine Größe, anhand derer man abschätzen kann, wie hoch der Anteil an nicht-krankhaftem bzw. krankhaftem Gewebe in der Probe ist.

Solche Größen sind in der Literatur u.A. als "Surrogatmarker" bekannt. Die Bestimmung des Expressionsmaßes dieses Gens kann somit zusätzlich zu der durch die histologisch-zytologische Untersuchung gewonnenen Kenntnis über die Gewebzusammensetzung der Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung zugrunde gelegt werden. Die Ergebnisse der histologisch-zytologischen Untersuchung könne durch die Bestimmung eines Surrogatmarkers also verifiziert werden.

Eine solche Größe kann aber auch ein für gesundes Gewebe typisches Genexpressionsmuster oder ein für eine bestimmte Tumorvariante bekanntes Expressionsverhältnis zwischen einem tumorspezifischen Gen und einem sowohl in gesunden als auch in erkrankten Geweben konstant exprimierten Gen ("housekeeping gene") sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es überdies, mögliche Surrogatmarker zu detektieren bzw. ihre Aussagefähigkeit zu validieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung ein Mikroarray bzw. ein Suspensionsarray verwendet wird. Bei Mikroarrays kann es sich z.B. um Chips handeln, auf deren Oberfläche in einer matrixartigen Anordnung molekulare Sonden immobilisiert sind (z.B. Antikörper, Oligonukleotide oder Polypeptide), wobei die Analyte aufgrund von Hybridisierungs- oder immunologischen Reaktionen an diese Sonden binden und mit einem Scanner nachgewiesen werden können. Mikroarrays werden häufig auch als Biochips bezeichnet.

Bei Suspensionsarrays kann es sich z.B. um Latexkugeln ("microbeads") handeln, auf deren Oberfläche molekulare Sonden immobilisiert sind (z.B. Antikörper, Oligonukleotide oder Polypeptide), wobei die Analyte aufgrund von Hybridisierungs- oder immunologischen Reaktionen an diese Sonden binden und mit einem Partikelzähler nachgewiesen werden können. Mikroarrays und Suspensionsarrays eignen sich je nach Ausgestaltung sowohl für den Nachweis von Nukleotiden als auch für den Nachweis von Peptiden oder Proteinen.

Darüber hinaus ist in weiteren bevorzugten Ausgestaltungen vorgesehen, dass die zu detektierenden Biomoleküle einem Markierungsschritt und/oder die zu detektierenden Nukleinsäuren einem Amplifikationsschritt unterzogen werden. Der Markierungsschritt kann z.B. darin bestehen, daß die in der Teilprobe vorhandenen mRNA-Moleküle mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase und Cy3-markierten Ribonukleotiden in markierte cRNA-Moleküle umgeschrieben werden. Ein anderes Beispiel für einen Markierungsschritt ist die Markierung von in der Teilprobe vorhandenen Proteinen mit Hilfe fluoreszenzgelabelter Antikörper oder Oligonu-

kleotide. Es sind jedoch auch andere nach dem derzeitigen oder dem zukünftigen Stand der Technik bekannte Markierungsschritte denkbar.

Der Amplifikationsschritt kann z.B. in einer PCR, einer rtPCR oder einem anderen Amplifikationsverfahren nach dem derzeitigen oder dem zukünftigen Stand der Technik bestehen.

In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen ist vorgesehen, dass die histologisch-zytologische Untersuchung mindestens einen Färbeschritt und/oder mindestens einen immunhistochemischen Schritt und/oder *in-situ*-Hybridisierungsschritt umfasst. Dabei kann vorgesehen sein, dass mehrere Schnitte bzw. Bohrkernproben jeweils unterschiedlichen histologisch-zytologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen werden, um eine größere Anzahl von Parametern zu erfassen. So kann z.B. eine Teilprobe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt werden, um die Zellkerne und die Häufigkeit von Mitosen sichtbar zu machen und quantitativ zu erfassen, während eine zweite Teilprobe mit einem tumorspezifischen Antikörper (z.B. anti-S-100 gegen maligne Melanome) und eine dritte Teilprobe z.B. mittels *in-situ*-Hybridisierung behandelt werden kann.

Es ist überdies vorgesehen, ein Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zum Aufbau einer Tumordatenbank, zur Entwicklung von individualisierten Krebstherapien, zur Einstellung eines Patienten auf eine individualisierte Krebstherapie und/oder zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen zu verwenden.

Eine mögliche Ausführungsform der Erfindung soll im folgenden durch ein nicht ausschließliches Beispiel beschrieben werden.

Zwei Tumoren gleichen Typs werden in einer Schnellschnittuntersuchung makroskopisch beurteilt und präpariert und anschließend auf einem geeigneten Träger, eingebettet in Medium in einem Gefriermikrotom aufgefroren.

Anschließend werden 6µm dicke Schnitte angefertigt, wobei der erste und der fünfte Schnitt auf einem Objektträger aufgenommen werden und einem Standardprotokoll entsprechend mit Hämatoxinilin-Eosin gefärbt werden. Die Schnitte werden zunächst histologisch begutachtet. Beide werden als Karzinom des Typs X identifiziert. Anschließend wird mittels digitaler Bildverarbeitung die Gewebszusammensetzung für jeden Schnitt quantitativ bestimmt. Das Ergebnis der morphologischen Untersuchung der Hämatoxinilin-Eosin-gefärbten Präparate ergibt folgendes Bild:

	Tumorparenchym	Tumorstroma
Tumor A	80 %	20 %
Tumor B	50 %	50 %

Tab. 1: histologisch ermittelte Gewebszusammensetzung der beiden Tumoren

Der zweite, dritte und vierte Schnitt (jeweils mit einer Dicke von 30µm) wird in einem Reaktionsgefäß mit RNA-later aufgenommen, um die Integrität der mRNA zu bewahren. Nach total-RNA Extraktion mit einem kommerziellen Kit (z.B. RNeasy von Qiagen) wird die poly-A RNA selektiv amplifiziert (Wang et al. Nature Biotechnology, April 2001), wobei je nach Bedarf eine bzw. zwei Amplifikationsrunden durchgeführt werden können. Nach einem abschließenden Markierungsschritt mit einem kommerziellen Markierungskit ist die amplifizierte RNA bzw. cDNA vorbereitet und kann durch Hybridisierung auf einem DNA-Microarray analysiert werden.

Auf diese Weise werden alle in dem untersuchten Gewebe vorhandenen mRNA-Moleküle quantitativ bestimmt. Man erhält also ein quantitatives Genexpressionsprofil, das mit Standard-Genexpressionsprofilen verschiedener Gewebe- und Tumorarten erstellten verglichen werden kann, um den diagnostizierten Tumor genauer zu bestimmen. Zur Zeit werden in verschiedenen Labors weltweit solche Standard-Genexpressionsprofile für eine Vielzahl von Tumor- und Gewebsarten ermittelt.

Im vorliegenden Beispiel wurde die Expression der Gene A - I untersucht. Man erhielt für die beiden untersuchten Tumoren die folgenden Genexpressionsprofile (Angaben in willkürlichen Einheiten):

Gen	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tumor A	2,4	4	0	0	0,8	2,4	3,2	2,4	1,6
Tumor B	1	2,5	1,5	2	0	1,5	1,5	1	0,5

Tab. 2: mittels Array-Experiment ermittelte Genexpressionsprofile der beiden Tumoren

Das Wissen über die Gewebszusammensetzung der beiden Tumoren wird nun für die Korrektur der Ergebnisse der Array-Experimente verwendet. Dabei wird unterstellt, dass das Gewebe in den Schnitten 2, 3 und 4 eine vergleichbare Struktur aufweist wie das Gewebe in den "Randschnitten" 1 und 5.

Unter Berücksichtigung der Kenntnis, dass Tumor A einen Parenchymanteil von 80 % und Tumor B einen Parenchymanteil von 50 % aufweist, erhält man die folgenden normierten Genexpressionsprofile:

Gen	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tumor A	3	5	0	0	1	3	4	3	2
Tumor B	2	5	3	4	0	3	3	2	1

Tab. 3: normierte Genexpressionsprofile der beiden Tumoren

Aus der Literatur seien die Standard-Genexpressionsprofile dreier Subtypen des Karzinoms X bekannt:

Gen	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Subtyp 1	2	5	3	4	0	3	3	2	1
Subtyp 2	3	5	0	0	1	3	4	3	2
Subtyp 3	2	4	2	1	3	5	3	2	3

Tab. 4: Standard-Genexpressionsprofile dreier Subtypen des Karzinoms X

Ein Vergleich der normierten Genexpressionsprofile mit den Standard-Genexpressionsprofilen ergibt, dass es sich bei Tumor A um den Subtyp 2 des Karzinoms X handelt, während es sich bei Tumor B um den Subtyp 1 des Karzinoms X handelt.

Die Differenzierung der beiden Tumoren ist allein durch die Array-Analyse und die anschließende Normierung der Genexpressionsprofile möglich. Die histologische Untersuchung ermöglicht lediglich die Identifizierung des Tumors als Karzinom X, nicht jedoch die Differenzierung in die beschriebenen Subtypen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Untersuchung einer einem Patienten entnommenen Gewebeprobe, deren genomische und/oder proteomische und/oder epigenomische und/oder biophysikalische Eigenschaften im wesentlichen erhalten sind, auf krankhafte Gewebeanteile, bei dem
 - a) aus der Gewebeprobe Schnitte hergestellt werden,
 - b) von denen mindestens einer einer histologisch-zytologischen und mindestens ein weiterer einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen werden,
dadurch gekennzeichnet, dass
 - c) bei der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens der quantitative Anteil des krankhaften Gewebes bzw. der krankhaften Zellen und/oder ein anderer morphologischer Aspekt in der Gewebeprobe mittels eines Bildverarbeitungssystems ermittelt wird, und
 - d) mindestens der ermittelte quantitative Anteil und/oder ein anderer morphologischer Aspekt als Bezugsgröße der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt wird.
2. Verfahren zur Untersuchung einer einem Patienten entnommenen Gewebeprobe, deren genomische und/oder proteomische und/oder epigenomi-

sche und/oder biophysikalische Eigenschaften im wesentlichen erhalten sind, auf krankhafte Gewebeanteile, bei dem

- a) aus der Gewebeprobe eine oder mehrere Stichproben entnommen werden,
- b) und mindestens eine Teilprobe der Stichprobe einer histologisch-zytologischen und mindestens eine weitere einer nicht-morphologischen Analyseuntersuchung unterzogen werden,

dadurch gekennzeichnet, dass

- c) bei der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens der quantitative Anteil des krankhaften Gewebes bzw. der krankhaften Zellen und/oder ein anderer morphologischer Aspekt in der Gewebeprobe bzw. der Stichprobe mittels eines Bildverarbeitungssystems ermittelt wird, und
 - d) mindestens der ermittelte quantitative Anteil und/oder ein anderer morphologischer Aspekt als Bezugsgröße der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stichprobe der Gewebeprobe mit Hilfe einer Bohrkernsonde, durch Aspiration oder durch Kratzpräparation entnommen wird.
4. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der histologisch-zytologischen Untersuchung zusätzlich das Erscheinungsbild und/oder das Verteilungsmuster des krankhaften Gewebes bzw. krankhafter Zellen in der Gewebeprobe ermittelt und der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt wird.

5. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Schnitte bzw. die Stichproben direkt aus der frischen Gewebeprobe hergestellt bzw. entnommen werden.
6. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Gewebeprobe vor Herstellung der Schnitte bzw. vor Entnahme der Stichproben eingefroren wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1- 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Gewebeprobe unmittelbar nach der Entnahme aus einem Patienten auf einen Träger aufgebracht und eingefroren wird und von der gefrorenen Gewebeprobe mit einem Mikrotom Schnitte angefertigt werden, die dann der histologisch-zytologischen bzw. der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführt werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Gewebeprobe nach der Anfertigung der Schnitte auf dem Träger verbleibt, so dass sie für die erneute Anfertigung von Schnitten zur Verfügung steht.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Träger, auf den die Gewebeprobe aufgebracht ist, so gestaltet ist, dass er in reproduzierbarer Weise in das Mikrotom eingebracht werden kann, so dass die Gewebeprobe bei jeder Anfertigung von Schnitten die gleiche relative Orientierung zum Mikrotom aufweist.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** der histologisch-zytologischen Untersuchung mindestens zwei Schnitte zugeführt werden, wobei diese so gewählt sind, dass sichergestellt

- ist, dass der oder die der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführten Schnitte *in situ* zwischen diesen Schnitten angeordnet waren.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 - 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Teilproben, die der histologisch-zytologischen Untersuchung zugeführt werden, so gewählt sind, dass sichergestellt ist, dass die der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugeführte Teilprobe mindestens eine Teilprobe *in situ* zwischen diesen Teilproben angeordnet war.
 12. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Verfahren in der intraoperativen oder der perioperativen klinisch bzw. experimentellen pathologischen Diagnostik bzw. Analytik eingesetzt wird.
 13. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das bei der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung verwendete Verfahren ein Verfahren zur Detektion von genomischer DNA, cDNA, mRNA, des epigenomischen Methylierungsmusters, Proteinen, viralen oder bakteriellen Nukleinsäuren oder anderer Biomoleküle oder ein Verfahren zur Bestimmung der biophysikalischen Eigenschaften einer Probe ist.
 14. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung eine Größe erfaßt wird, die es ermöglicht, den Anteil an krankhaftem Gewebe und/oder anderer Gewebekomponenten in der Gewebeprobe zu ermitteln, und dass der solchermaßen ermittelte Anteil zusätzlich quantitativ der Auswertung der Ergebnisse der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zugrunde gelegt wird.

15. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung ein Mikroarray bzw. ein Suspensionsarray verwendet wird.
16. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zu detektierenden Biomoleküle einem Markierungsschritt unterzogen werden.
17. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die im Rahmen der nicht-morphologischen Analyseuntersuchung zu detektierenden Nukleinsäuren einem Amplifikationsschritt unterzogen werden.
18. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die histologisch-zytologische Untersuchung mindestens einen Färbeschritt umfasst.
19. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die histologisch-zytologische Untersuchung mindestens einen immunhistochemischen Schritt und/oder *in-situ*-Hybridisierungsschritt umfasst.
20. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** mehrere Schnitte jeweils unterschiedlichen histologisch-zytologischen Untersuchungen unterzogen werden.

21. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zum Aufbau einer Tumordatenbank.
22. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Entwicklung von individualisierten Krebstherapien.
23. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Einstellung eines Patienten auf eine individualisierte Krebstherapie.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/001984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N1/30 G01N33/48 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 2003/186248 A1 (ERLANDER MARK G ET AL) 2 October 2003 (2003-10-02) abstract paragraph '0004! - paragraph '0005! paragraph '0007! paragraph '0009! - paragraph '0010! paragraph '0012! - paragraph '0013! paragraph '0015! - paragraph '0024! paragraph '0027! - paragraph '0028! paragraph '0034! - paragraph '0038! paragraph '0042! - paragraph '0043! paragraph '0059! - paragraph '0066! paragraph '0092! example 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-11, 13-21



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 2005

Date of mailing of the international search report

28/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bockstahl, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/001984

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SGROI D C ET AL: "IN VIVO GENE EXPRESSION PROFILE ANALYSIS OF HUMAN BREAST CANCER PROGRESSION"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 5656-5661, XP000994514</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>the whole document</p>	1-11, 13-21
X	<p>KITAHARA O ET AL: "ALTERATIONS OF GENE EXPRESSION DURING COLORECTAL CARCINOGENESIS REVEALED BY CDNA MICROARRAYS AFTER LASER-CAPTURE MICRODISSECTION OF TUMOR TISSURES AND NORMAL EPITHELIA"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 61, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 3544-3549, XP001157021</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>the whole document</p>	1-11, 13-21
X	<p>US 2003/049701 A1 (MURACA PATRICK J)</p> <p>13 March 2003 (2003-03-13)</p> <p>abstract</p> <p>paragraph '0009!</p> <p>paragraph '0012!</p> <p>paragraph '0015!</p> <p>paragraph '0044!</p> <p>paragraph '0056! - paragraph '0058!</p>	1-11, 13-21
A	<p>LAKHANI S R ET AL: "Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past?"</p> <p>NATURE REVIEWS. CANCER. NOV 2001, vol. 1, no. 2, November 2001 (2001-11), pages 151-157, XP008047828</p> <p>ISSN: 1474-175X</p> <p>the whole document</p>	1-11, 13-21
A	<p>US 2002/076724 A1 (FINKELSTEIN SYDNEY DAVID ET AL) 20 June 2002 (2002-06-20)</p> <p>abstract</p> <p>paragraph '0004!</p> <p>paragraph '0006!</p> <p>paragraph '0010! - paragraph '0011!</p>	1-11, 13-21
A	<p>EP 1 067 374 A (EPPENDORF AG)</p> <p>10 January 2001 (2001-01-10)</p> <p>abstract; figure 1</p> <p>paragraph '0005! - paragraph '0006!</p> <p>paragraph '0018! - paragraph '0021!</p>	1-11
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/001984

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 533 342 A (GORDON ET AL) 9 July 1996 (1996-07-09) abstract; figure 1 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/001984

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12, 22, 23**

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box II.1

Claims 12, 22, 23

PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery.

PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by therapy.

PCT Rule 39.1(iv) – diagnostic methods practised on the human or animal body.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/001984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003186248 A1	02-10-2003	AU 2003233459 A1 EP 1490516 A1 WO 03083141 A1	13-10-2003 29-12-2004 09-10-2003
US 2003049701 A1	13-03-2003	AU 1183502 A AU 7011101 A CA 2414062 A1 EP 1305595 A2 JP 2004500891 T WO 0198525 A2 WO 0226195 A2 US 2002009767 A1	08-04-2002 02-01-2002 27-12-2001 02-05-2003 15-01-2004 27-12-2001 04-04-2002 24-01-2002
US 2002076724 A1	20-06-2002	US 6340563 B1 CA 2198774 A1 EP 0782633 A1 JP 10506280 T WO 9609410 A1	22-01-2002 28-03-1996 09-07-1997 23-06-1998 28-03-1996
EP 1067374 A	10-01-2001	DE 19932032 A1 EP 1067374 A2 JP 2001041864 A US 6673086 B1	01-02-2001 10-01-2001 16-02-2001 06-01-2004
US 5533342 A	09-07-1996	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/001984

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N1/30 G01N33/48 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>US 2003/186248 A1 (ERLANDER MARK G ET AL) 2. Oktober 2003 (2003-10-02) Zusammenfassung Absatz '0004! - Absatz '0005! Absatz '0007! Absatz '0009! - Absatz '0010! Absatz '0012! - Absatz '0013! Absatz '0015! - Absatz '0024! Absatz '0027! - Absatz '0028! Absatz '0034! - Absatz '0038! Absatz '0042! - Absatz '0043! Absatz '0059! - Absatz '0066! Absatz '0092! Beispiel 1</p> <p style="text-align: center;">----- --/--</p>	<p>1-11, 13-21</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Juni 2005

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

28/06/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bockstahl, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SGROI D C ET AL: "IN VIVO GENE EXPRESSION PROFILE ANALYSIS OF HUMAN BREAST CANCER PROGRESSION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 59, Nr. 22, 15. November 1999 (1999-11-15), Seiten 5656-5661, XP000994514 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-11, 13-21
X	KITAHARA O ET AL: "ALTERATIONS OF GENE EXPRESSION DURING COLORECTAL CARCINOGENESIS REVEALED BY CDNA MICROARRAYS AFTER LASER-CAPTURE MICRODISSECTION OF TUMOR TISSURES AND NORMAL EPITHELIA" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 61, Nr. 9, 1. Mai 2001 (2001-05-01), Seiten 3544-3549, XP001157021 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-11, 13-21
X	US 2003/049701 A1 (MURACA PATRICK J) 13. März 2003 (2003-03-13) Zusammenfassung Absatz '0009! Absatz '0012! Absatz '0015! Absatz '0044! Absatz '0056! - Absatz '0058!	1-11, 13-21
A	LAKHANI S R ET AL: "Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past?" NATURE REVIEWS. CANCER. NOV 2001, Bd. 1, Nr. 2, November 2001 (2001-11), Seiten 151-157, XP008047828 ISSN: 1474-175X das ganze Dokument	1-11, 13-21
A	US 2002/076724 A1 (FINKELSTEIN SYDNEY DAVID ET AL) 20. Juni 2002 (2002-06-20) Zusammenfassung Absatz '0004! Absatz '0006! Absatz '0010! - Absatz '0011!	1-11, 13-21
A	EP 1 067 374 A (EPPENDORF AG) 10. Januar 2001 (2001-01-10) Zusammenfassung; Abbildung 1 Absatz '0005! - Absatz '0006! Absatz '0018! - Absatz '0021!	1-11

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/001984

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 5 533 342 A (GORDON ET AL)</p> <p>9. Juli 1996 (1996-07-09)</p> <p>Zusammenfassung; Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1-11

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 12, 22, 23
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.1

Ansprüche Nr.: 12,22,23

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur chirurgischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

Regel 39.1(iv) PCT - Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/001984

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003186248 A1	02-10-2003	AU 2003233459 A1 EP 1490516 A1 WO 03083141 A1	13-10-2003 29-12-2004 09-10-2003
US 2003049701 A1	13-03-2003	AU 1183502 A AU 7011101 A CA 2414062 A1 EP 1305595 A2 JP 2004500891 T WO 0198525 A2 WO 0226195 A2 US 2002009767 A1	08-04-2002 02-01-2002 27-12-2001 02-05-2003 15-01-2004 27-12-2001 04-04-2002 24-01-2002
US 2002076724 A1	20-06-2002	US 6340563 B1 CA 2198774 A1 EP 0782633 A1 JP 10506280 T WO 9609410 A1	22-01-2002 28-03-1996 09-07-1997 23-06-1998 28-03-1996
EP 1067374 A	10-01-2001	DE 19932032 A1 EP 1067374 A2 JP 2001041864 A US 6673086 B1	01-02-2001 10-01-2001 16-02-2001 06-01-2004
US 5533342 A	09-07-1996	KEINE	